



乳糖分解酵素の転移反応で生成するオリゴ糖の分析技術の開発に関する研究

著者	木村 一雅
号	55
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1212号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126269

きむら かずまさ

氏 名（本 籍 地） 木村 一雅

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1212 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 30 年 9 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）生物産業創成科学専攻

論 文 題 目 乳糖分解酵素の転移反応で生成するオリゴ糖の分析技術の開発に関する研究

博士論文審査委員 （主査）准教授 北澤 春樹

教授 駒井 三千夫

教授 阿部 敬悦

博士論文内容要旨

乳糖分解酵素の転移反応で生成するオリゴ糖の
分析技術の開発に関する研究

東北大学大学院農学研究科

生物資源創成科学専攻

木 村 一 雅

指導教員

北澤 春樹 准教授

第一章 緒 論

ヒト腸管には、約 1,000 種、100 兆個にも及ぶ腸内細菌が生息し、複雑な微生物生態系が形成されている。これらの腸内菌叢（腸内フローラ）は、ヒトの健康に大きな影響を及ぼしていることが知られている。健常な腸内菌叢を構成する細菌は腸内常在菌と言われ、宿主であるヒトと共生関係を形成している。近年、ヒトの健康と腸内菌叢についての多くの研究から、構成細菌の多様性の維持が重要であると言われている。

腸内常在菌であるビフィズス菌は新生児が授乳を始めると間もなく腸内の最優勢菌種となり、いわゆるビフィズスフローラを形成する。母乳栄養児と比べ人工栄養児では、ビフィズスフローラ形成の遅れやビフィズス菌の占有率が低下する傾向がみられ、乳児では同フローラの形成が健康を保つ指標になっている。1995 年 Gibson により、ヒトの健康に有用な働きをする微生物に対して「プロバイオティクス」という用語が提唱された。一方、食物として摂取した難消化性オリゴ糖や食物繊維などは、宿主に有益な働きをする腸内細菌の増殖を促し腸内環境を改善することが知られており、Fuller は、①上部消化管で分解・吸収されない、②大腸に共生する有益な細菌の選択的な栄養源となり、それらの増殖を促進する、③大腸の腸内菌叢の構成を健康的なバランスに改善し維持する、④ヒトの健康の増進・維持に役立つ、という条件を満たす食品成分を「プレバイオティクス」とよぶことを提唱した。

プレバイオティクスは、日本においては、乳酸菌、食物繊維とともに特定保健用食品（トクホ）の「おなかの調子を整える」というジャンルの食品として位置付けられ、各種オリゴ糖が表示許可を受けている。中でもガラクトオリゴ糖（GOS: galacto-oligosaccharide）は母乳中に存在する天然糖として代表的なプレバイオティクスであり¹⁾、育児用調整粉乳にも添加されている。

GOS は乳糖分解酵素の逆合成反応で生産され、使用する乳糖分解酵素の特異性によりオリゴ糖異性体の構造や組成が異なる混合物である。GOS のトクホ申請に際しては、それら構成オリゴ糖類の種類と量を食品中で精密に分析する技術の確立と、主要な成分の単離精製標品の提供が求められた。オリゴ糖に関して、当時これらの要件を満たす簡便な糖質分析技術は存在せず、既存技術での対応は極めて困難であった。

本研究では、GOS が還元性オリゴ糖である特徴を利用して、UV 吸収および蛍光を有するピリジルアミノ（PA）誘導体化を行うことで、構造の類似した糖鎖を分離・定量する技術の開発を行った。さらに、誘導体化技術の改善を進めると共に、構築した分析技術を応用して、酵素反応の制御、乳糖分解酵素による転移反応の特性の解析、ヒト腸内細菌によるオリゴ糖の資化性の解析などへと研究を発展させた。

第二章 ピリジルアミノ化および NMR によるガラクトオリゴ糖の構造決定

糖タンパク質糖鎖の構造解析手法として、長谷らが開発した PA 誘導体化法を GOS のような低分子量のオリゴ糖異性体混合物の分析に最適化した。得られた PA 化糖を汎用性の高い逆相高速液体クロマトグラフィー (ODS-HPLC) に供し、構造が類似したオリゴ糖異性体を分離する良好な分析条件を得た。また、検出に UV 吸収 (OD 310nm) を用いることで定量的な解析が行えることを見いだした。分離した PA 化オリゴ糖は、 ^1H -および ^{13}C -NMR (核磁気共鳴スペクトル法) により非破壊的に解析して、化学構造を決定した²⁾。

GOS は二糖から六糖程度の構造の類似した多数の異性体の混合物である。GOS を Bio-Gel P-2 によるゲルろ過に供し、糖鎖の重合度別に 5 つの画分 (DP1~DP5) に分画した。精製した DP2~DP4 の画分から各々、改良した PA 誘導体化法により試料を調製した (Fig. 1)。得られた糖鎖長別 PA 化オリゴ糖は ODS-HPLC を用いて各異性体成分を分離した。HPLC に用いるカラムおよび溶離液の組成については種々の検討を行い、シリカゲル基剤の細孔径が 300 Å でモノメリック型の ODS カラムでのみ高度の相互分離が得られることを見いだした (Fig. 2)。構築した分離条件で各糖鎖長の PA 化糖鎖を分取し、21 種の PA 化オリゴ糖成分を得た。単一成分として得られた糖鎖は、 ^1H -および ^{13}C -NMR により化学構造を決定した (Table 1)。

単離した PA 化糖鎖は、一部を加水分解すると還元末端の PA 化単糖が得られ、21 種のすべてが Gal-PA と Gal、または Glc-PA と Gal のみを含むオリゴ糖異性体であることが確認された。各 PA 化オリゴ糖の糖残基数は、NMR スペクトルにおける単純化したアノマー炭素シグナルの数からも確認された。糖の結合様式は、各種 2D (二次元) NMR により決定した。また、主要なオリゴ糖成分の極大吸収の 310nm における分子吸光係数を求めたところ、6724~6907 でほぼ一致することが確認された。従って、同一糖鎖長のオリゴ糖異性体の構成比は、ODS-HPLC の UV 310nm 検出によるクロマトグラムのピーク面積比から算出することが可能であった。

NMR による構造決定は信号の分離がよい ^{13}C -NMR を基本とし、 ^1H -NMR との異核種二次元相関スペクトルおよび ^1H -Relayed-COSY スペクトルを用いて検討した。この分析により二糖から四糖までの有益な構造情報が得られた。

オリゴ糖 PA 誘導体化操作を簡便にする目的で、各オリゴ糖の PA 化反応時の試薬の最小必要量を明らかにし、反応混合物から目的とする PA 化糖を効率よく単離精製するために、電気透析による前処理方法を考案した (Fig. 3)。適切な透析膜を選択することにより、二糖以上の PA 誘導体の反応後の前処理を簡便、迅速、かつ高収率で行う手法を開発した³⁾。

構築した PA 誘導体化による糖鎖の分析技術を応用して、市販牛乳中の天然の GOS の構造決定および定量⁴⁾、各種乳糖分解酵素による GOS 生成反応⁵⁾の解析に応用した。その際、*Streptococcus thermophilus* 由来の乳糖分解酵素の転移反応で新たな発見があった。基質乳糖の残存濃度と反応生成物の経時変化を観察すると、従来、同酵素で報告されていた生成物と異なる 3'-GOS 糖 (Gal-Gal 結合が $\beta(1\rightarrow3)$ 結合様式のガラクトオリゴ糖) を豊富に含む糖鎖が生成する条件を見いだした (Fig. 4)⁶⁾。この方法で、kg スケールで同オリゴ糖を調製することが可能となった。3'-GOS はカンガルーやワラビーなどの有袋類の乳の主要な糖質であることが知られており、オーストラリアの動物保護機関からの提供依頼に貢献した。

本研究の技術によって、GOS の開発中に遭遇した、GOS 成分による極めてまれなアレルギーの原因糖鎖の構造を決定し、それらの成分を生成しない酵素を選択して安全な新規 GOS の開発に繋げることができた⁷⁾。

第三章 糖鎖ピリジルアミノ誘導体の C2 位置換体は蛍光強度を増大させる

PA 化糖鎖の分析法の一般化を目的に、PA 化オリゴ糖の構造の違いが、UV 吸収および蛍光強度にどの程度影響するのか、 α 結合および β 結合グルコビオース類計 8 種、乳糖、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、N-アセチラクトサミンをモデル糖鎖として解析した。

すでに、主要な GOS 成分の分子吸光係数はほぼ同一の 7000 程度であること、PA 誘導体化が可能であれば、個々の検量線を作成せずにクロマトグラムの面積比で定量が可能であることを確認していた。同一官能基に基づく吸光度は溶液の条件が同じであれば異性体間で大きな差は生じにくく、解析対象が食品成分など、含有量が%オーダーと高い場合には、PA 化糖は UV 検出で十分な感度が得られ有効である。

8 種のグルコビオースのモル吸光係数 (ϵ) を求めたところ、Glc β 1-2Glc の ϵ は 7440 で、他の 7 種の糖鎖に比べ明らかに高い値を示した。しかし、この値はグルコビオース 8 種のモル吸光係数の平均値が 6860 ± 239 であるのに対して、約 3.5% の狭い範囲の違いであった (Table 2)。

一方、同一条件下の単位モル濃度当たりの蛍光強度は、 α 結合グルコビオースでは平均 1.89×10^7 (バンド幅 3nm) であったのに対し、 β 結合グルコビオースでは、結合様式により 1.89×10^7 から 3.85×10^7 と大きな差が見られた

(Table 3)。以上の結果から、糖鎖の PA 誘導体の HPLC を、UV で検出するとクロマトグラムの面積値から組成を概算することが可能であるが、蛍光検出では、アミノ糖を含む還元末端 2 位の置換によって強度の大幅な増加があるため、定量に際しては注意が必要であることが明らかとなった (Fig. 4)⁸⁾。

第四章 ガラクトオリゴ糖およびオリゴ糖製品 7 種のヒト由来各種ビフィズス菌による *in vitro* 利用性試験

腸内環境の改善を目的とする数種のオリゴ糖が特定保健用食品として表示許可を得ている。しかし、それらのオリゴ糖のヒト腸内細菌による利用性を比較検討した報告は見られない。そこで、ヒト由来ビフィズス菌で高い増殖性を示す乳糖を対照として、市販品の GOS、フラクトオリゴ糖 (FOS)、長鎖フラクトオリゴ糖 (Fib)、ゲンチオオリゴ糖 (GEO)、イソマルトオリゴ糖 (IMO)、ラクトスクロース (LS)、ニゲロオリゴ糖 (NOS)、キシロオリゴ糖 (XOS) および FOS を構成する単糖のフラクトース (Fru) および三糖のケーストース (Kes)、四糖のニストース (Nis) の純品について、主要なヒト常在ビフィズス菌 16 菌株 (Table 3) の増殖性と、培地中のオリゴ糖構成糖質の消長を、オリゴ糖分析技術を応用して HPLC で解析した⁹⁾。

乳糖、GOS、LS、NOS、GEO の各オリゴ糖による培養では、ビフィズス菌 16 菌株すべてが高い増殖性を示した。一方、FOS および Fib は、*B. breve* の 4 菌株中 2 菌株、*B. bifidum* の 4 菌株すべてで生育が見られなかった。XOS は *B. breve*、*B. bifidum*、*B. longum* subsp. *infantis* の 1 菌株で増殖が見られず、*B. adolescentis*、*B. longum* subsp. *longum* で増殖の遅延が認められた。IMO は *B. bifidum* の 4 菌株中 3 菌株で増殖が認められなかった (Table 4)。

FOS で増殖しなかった *B. breve*、*B. bifidum* の 6 菌株を含む 16 菌株について、FOS を構成する Fru および Kes、Nis の純品を用いて増殖性を検討した。その結果、FOS で増殖しなかった 6 菌株はいずれも Fru では増殖したが、Kes および Nis では増殖しなかった (Table 5)。一方、Kes、Nis で増殖した菌株では、Kes が消費され、少量のショ糖と Fru が培地中に生成した菌株と Nis が消費され、Fru が生成する菌株が見られ、菌体外での糖鎖の分解を伴う消費が示唆された。

FOS や IMO などの DP3 以上の糖鎖や XOS は難消化性で、小腸で吸収されない。しかし、これらのオリゴ糖では、乳児から高頻度で検出されるビフィズス菌の増殖性は悪く、成人で検出頻度の高い菌種では増殖性が高い特徴が見られた。一方、オリゴ糖の構造中に乳糖骨格を有する LS や GOS は、乳児から成人までの広い範囲のビフィズス菌種で高い増殖性を示した。これらはビフィズス菌の高い乳糖代謝能によるものと考えられた。プレバイオティクスの機能をビフィズス菌や乳酸菌などの増殖に伴う腸内環境の形成とすると、共生する他の常在菌によるオリゴ糖の分解や生成した糖の利用性を加味した検討がさらに必要と考えられる^{10,11)}。

第五章 総括

本研究では、まず GOS の分析技術を確立した。さらに、それを応用することでオリゴ糖開発の進展に様々な形で貢献した。

1. 複雑な異性体の混合物である GOS の化学的解析に当たり、オリゴ糖の還元末端糖鎖を PA 誘導体とし逆相 HPLC を用いて、従来困難であった同一糖鎖長の異性体を相互に分離する方法を確立した。HPLC で分取した各成分は単一で、NMR 解析によって詳細な構造を決定することができた。

PA 誘導体の HPLC の技術を応用して、牛乳中の天然の GOS の同定および定量、各種乳糖分解酵素による GOS 生成反応の特性の解析を行った。その際、*Streptococcus thermophilus* 由来乳糖分解酵素の転移反応の位置特性はそれまでの報告と異なっており、基質乳糖濃度と反応時間を制御することで、酵素的合成が困難とされていた Gal β 1-3Gal β 1-4Glc (3'-GL) の大量合成が可能となった。

PA 化糖の HPLC による高い分離能を応用して、GOS の開発過程で遭遇したアレルギーの原因物質を特定し、それらを生成しない新たな GOS の開発に繋げることができた。

2. PA 誘導体化法の汎用性を高める目的で、還元性の Glc 二糖類 8 種、乳糖等の純品をモデル試料として PA 誘導体を調製し、単位濃度当たりの UV 吸収と蛍光強度を求めた。その結果、還元末端の炭素 2-置換体において蛍光強度および紫外吸収強度の増加が観測された。特に蛍光強度は最大で 2 倍程度の増加が観察された。一方、UV は 2-置換体で 1.2 倍程度の増加にとどまったことから、HPLC の検出に UV 310nm を用いることで、標準試料が無くとも、ピーク面積の比率から $\pm 10\%$ 以内の誤差で定量が可能であることが明らかとなった。
3. 上述のオリゴ糖の分析技術を用いて、トクホ表示許可を得ている市販オリゴ糖 8 種による、ヒト常在ビフィズス菌 7 菌種 16 菌株の増殖性と、増殖に伴うオリゴ糖成分の消長を、オリゴ糖分析技術を応用して観察した。また一部の菌株で増殖が見られなかった FOS について、構成成分 Kes、Nis 純品を用いて同様の増殖性試験とオリゴ糖の消長を追跡した。

LS、GOS は被験ビフィズス菌のすべてで高い増殖性を示した。一方、FOS や IMO などの DP3 以上の糖鎖や XOS は、乳児で高頻度に検出されるビフィズス菌に対しては増殖性が低く、成人で検出頻度の高い菌種で高い増殖性が見られた。各オリゴ糖のプレバイオティクスとしての機能の差異を知るためには、大腸内の他の常在細菌による糖鎖の加水分解と糖質の利用性などの共生関係について、さらに解析を進める必要があると考えられた。

<参考文献>

- 1) Asakuma, S., Urashima, T., Akahori, M., Obayashi, H., Nakamura, T., Kimura, K., Watanabe, Y., Arai, I., Sanai, Y.: Variation of minor neutral oligosaccharides levels in human colostrum. *Eur. J. Clin. Nutr.* **62**, 488-494 (2008)
- 2) Kimura, K., Matsumoto, K., Ishihara, C., Harada, K., Miyagi, A.: Structure determination of galacto-oligosaccharides by pyridylamination and NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **270**, 33-42 (1995)
- 3) 木村一雅, 石原知代子, 宮城明彦: ピリジルアミノ化誘導体の処理法. 特許第 3231103 号
- 4) 木村一雅, 渡邊陽子, 松本圭介, 宮城昭彦: 市販牛乳中に含まれるガラクトオリゴ糖の分析. ヤクルト研究所研究報告集. (第 17 号) (1998)
- 5) 長南治, 柴原(曾根) 春恵, 高橋理恵, 池田雅和, 菊地(早川) 弘子, 石川文保, 木村一雅, 松本圭介: ガラクトオリゴ糖の難消化性の検討. 日本食品科学工学会誌. **51**, 23-33 (2004)
- 6) 木村一雅, 渡邊陽子, 松本圭介, 池田雅和, 宮城昭彦, 大江田和年, 溝渕尚宏: 3'ガラクトオリゴ糖含有糖組成物の製造法. 特許公報 (B2) 特許第 3871371 号
- 7) Kaneko, K., Watanabe, Y., Kimura, K., Matsumoto, K., Mizobuchi, T., Onoue, M.: Development of hypoallergenic galacto-oligosaccharides on the basis of allergen analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 100-108 (2014)
- 8) Kimura, K., Ishihara, C., Sotoya, H., Miyagi, A., Urashima, T., Saito, T.: Substitution at the C2-position of reducing end sugar increases the fluorescence intensity on pyridylaminated sugar.
(糖鎖ピリジルアミノ (PA) 誘導体の C2 位置換体は蛍光強度を増大させる)
Biosci. Biotechnol. Biochem. 誌への投稿準備中
- 9) Yamada, T., Akiyaka, T., Hatano, H., Kimura, K.: In Vitro Assessment of Oligosaccharides Assimilation by Intestinal Anaerobic Bacteria. *Milk Science*, **64**, 87-98 (2015)
- 10) Akiyama, T., Kimura, K., Hatano, H.: Diverse galactooligosaccharides consumption by bifidobacteria; Implications of β -galactosidase-LacS operon. *Biosci Biotechnol Biochem.* **79**, 664-672 (2015)
- 11) 木村一雅, 北澤春樹, 斎藤忠夫: ガラクトオリゴ糖およびオリゴ糖製品 7 種のヒト由来各種ビフィズス菌による *in vitro* 利用性試験. ミルクサイエンス. **67**, 88-101 (2018)

Fig. 1 PA 誘導体化の手順

オリゴ糖サンプル 50 μ g

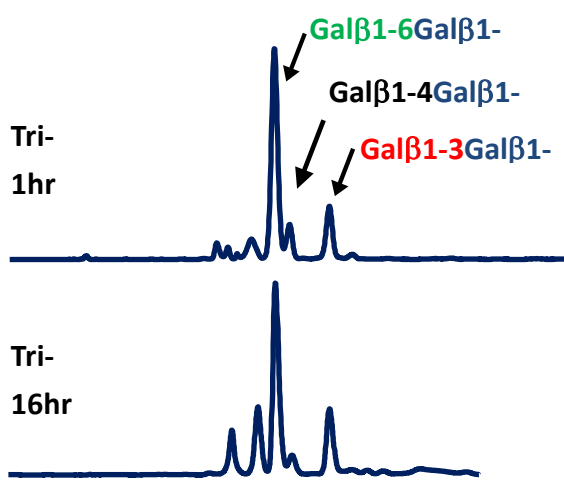
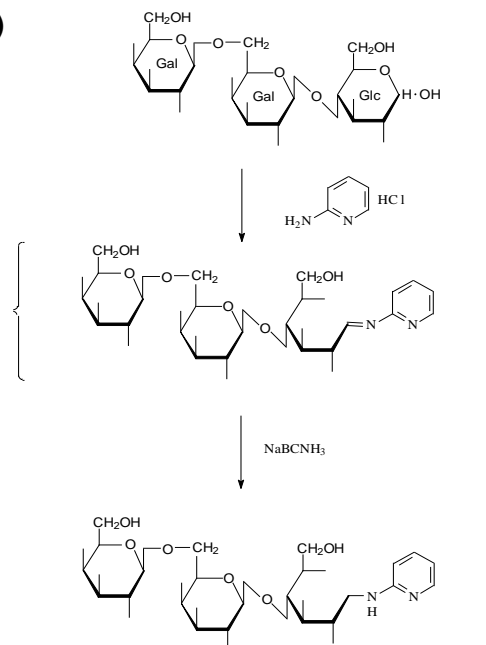
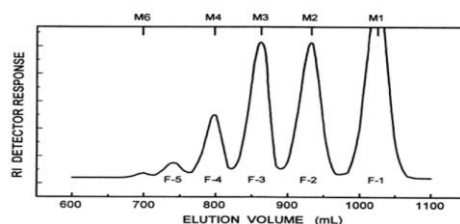
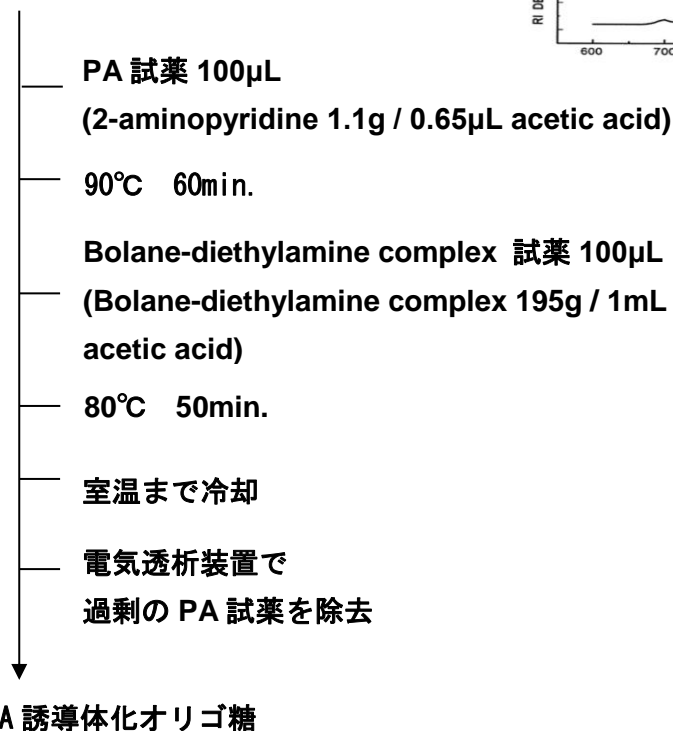


Table 1 *Asp. oryzae* β -galactosidase
による主な GOS 反応生成物の構造

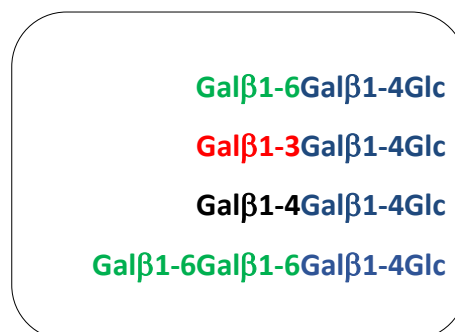


Fig. 2 *Asp. oryzae* β -galactosidase による GOS
反応生成の PA 誘導体の ODS-HPLC

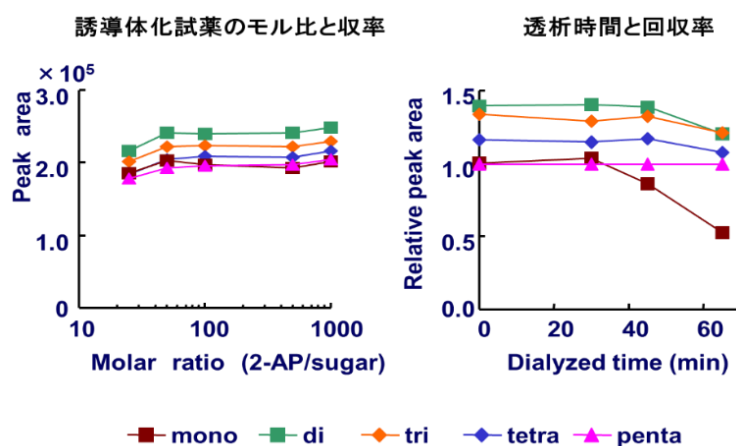


Fig. 3 電気透析法を用いたオリゴ糖 PA 誘導体化の回収率

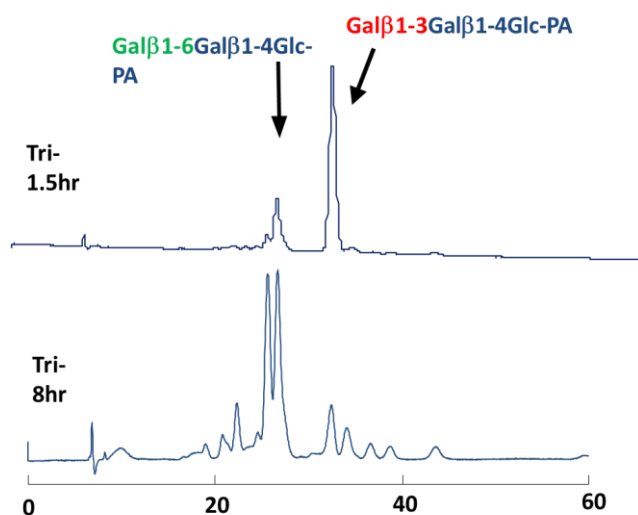


Fig. 4 *Streptococcus thermophilus* β -galactosidase による GOS 反応生成の PA 誘導体の ODS-HPLC

Table 2 PA 化グルコース 2 糖類のモル吸光

α 体	1M酢酸	0.2M クエン酸緩衝液	β 体	1M酢酸	0.2M クエン酸緩衝液
α 1-2	6740	6640	β 1-2	7440	7190
α 1-3	6730	6630	β 1-3	6800	6530
α 1-4	6820	6630	β 1-4	6850	6440
α 1-6	6780	6630	β 1-6	6720	6220

1M 酢酸溶液の 8 種平均値 : 6860
 0.2M クエン酸緩衝液(pH4.5)中の
 8 種の平均値 : 6610 λ_{\max} 310nm

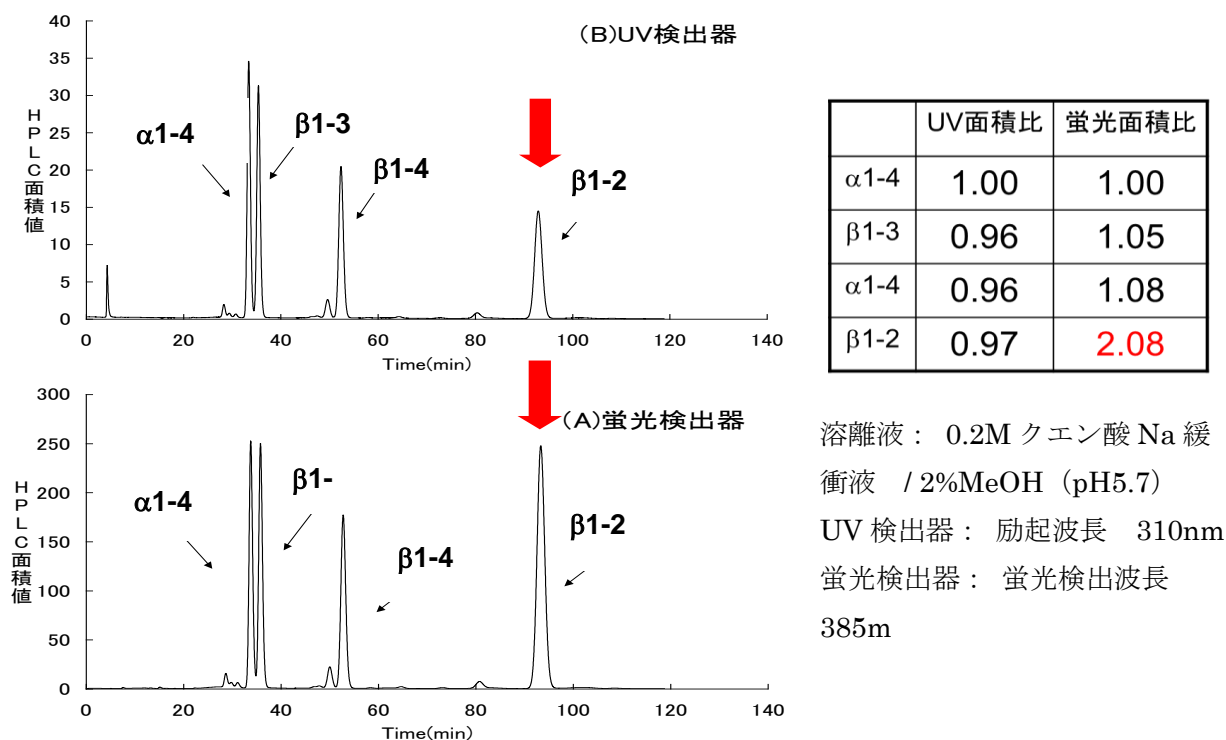


Fig. 5 UV および蛍光検出器を直列接続して測定した PA 化グルコビオースの ODS-HPLC

Table 3 試験に用いたヒト常在ビフィズス菌

Strain	YIT	Origin	
<i>B. breve</i>	4065	isolate	infant
	4014	ATCC15700	
	4015	ATCC15698	
	4009	isolate	
<i>B. bifidum</i>	4007	isolate	infant・adult
	4039	ATCC29521	
	4069	isolate	
	4001	isolate	
<i>B. adolescentis</i>	4011	ATCC15703	adult
	4045	NCD02229	
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	4018	ATCC15697	infant
	4020	ATCC25962	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	4021	ATCC15707	infant・adult
	4037	ATCC15708	
<i>B. catenulatum</i>	4016	ATCC27539	adult
<i>B. pseudocatenulatum</i>	4072	ATCC27919	adult

Table 4 ヒト常在ビフィズス菌による各種オリゴ糖製品資化性試験の klett 値の推移

Strain	YIT No.	1day (24hr.)									2day (48hr.)									7day (168hr.)								
		FOS	Fib	XOS	IMO	GEO	NOS	LS	GOS	Lac	FOS	Fib	XOS	IMO	GEO	NOS	LS	GOS	Lac	FOS	Fib	XOS	IMO	GEO	NOS	LS	GOS	Lac
<i>B. breve</i>	4065	31	10	10	294	163	280	405	355	380	74	13	24	360	330	365	460	410	420	130	63	32	365	365	365	465	420	435
	4009	34	9	35	298	298	330	390	340	375	85	29	35	355	370	350	430	375	405	83	19	35	375	395	365	445	395	420
	4014	268	95	25	256	294	252	350	325	365	28	170	29	274	305	294	405	340	390	345	197	34	320	335	335	415	370	420
	4015	282	114	4	254	286	298	296	325	113	29	164	19	280	315	320	335	350	375	340	166	24	305	360	335	365	380	415
<i>B. bifidum</i>	4007	73	42	11	48	56	188	232	170	202	76	57	17	340	256	204	470	197	248	76	35	32	410	320	352	477	256	282
	4001	53	30	9	27	126	113	60	240	222	55	30	11	47	201	157	113	280	278	74	25	11	46	240	187	153	330	315
	4039	43	17	8	36	144	133	9	121	115	35	12	8	33	220	178	198	177	197	79	26	12	38	252	178	174	222	252
	4069	47	29	12	40	208	171	136	246	222	49	32	12	40	274	198	176	310	298	45	28	23	36	305	226	232	345	320
<i>B. infantis</i>	4018	52	17	34	310	260	310	435	355	395	28	350	25	375	330	370	470	425	450	340	355	70	380	375	375	490	435	455
	4020	230	340	4	280	272	238	238	238	325	27	405	26	340	340	325	335	340	375	292	380	31	350	355	330	380	360	380
<i>B. adolescentis</i>	4011	310	292	71	270	228	290	294	238	274	35	330	234	310	310	330	335	315	327	395	370	234	365	360	380	390	373	380
	4045	258	167	88	158	123	137	204	274	298	30	208	194	208	298	238	264	325	335	315	214	220	240	274	270	278	325	355
<i>B. longum</i>	4021	380	91	131	280	345	305	388	340	375	36	133	325	310	360	350	435	405	430	395	244	345	350	395	360	470	440	470
	4037	272	78	25	216	267	302	242	302	276	34	220	238	330	330	315	395	360	370	360	278	238	330	360	330	440	390	410
<i>B. catenulatum</i>	4016	286	270	186	230	268	264	292	266	190	35	320	305	310	345	320	360	355	365	385	345	320	345	365	350	390	385	410
<i>B. pseudocatenulatum</i>	4082	282	195	240	216	242	292	8	64	124	36	242	302	320	370	345	282	375	355	385	284	310	355	405	380	370	420	395

Table 5 ヒトビフィズス菌による FOS 構成オリゴ糖の資化性試験

Initial concentration		YIT No.	Carbon source (mM)																	
			Fru	FOS							Kestose					Nistose				
			klett	klett	Fru	Glc	Suc	Kes	Nis	Fnis	klett	Fru	Glc*	Suc	Kes	klett	Fru	Glc*	Suc	Kes
start of culture		56		1.3	7.5	1.3	12.2	17.6	2.0		0.0	6.6	0.0	38.6		0.0	7.0	0.0	0.0	30.8
B. breve	4065	294	25	0.1	-1.6	-0.3	-0.6	-0.8	-0.1	12	0.0	0.3	0.0	-1.8	13	0.0	0.1	0.0	0.0	-2.2
	4009	385	20	0.0	-1.4	0.0	-0.2	0.0	0.0	14	0.0	-0.4	0.0	-3.1	5	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.1
	4014	370	266	0.0	-1.7	-0.9	-12.0	-2.2	-0.2	380	15.3	0.6	2.0	-34.1	244	0.9	-0.5	0.0	0.0	-8.7
	4015	400	280	0.0	-1.9	-0.7	-11.9	-2.0	-0.2	355	4.0	0.1	2.4	-25.2	218	2.0	-0.1	0.0	0.0	-8.5
B. bifidum	4007	330	23	0.5	-1.0	0.3	0.0	0.1	0.0	8	0.0	0.2	0.0	0.8	12	0.0	-1.2	0.0	0.0	-1.8
	4001	330	23	0.4	-1.3	0.1	-0.2	0.1	0.2	9	0.0	0.4	0.0	-3.3	6	0.0	0.2	0.0	0.0	-3.2
	4039	292	21	1.2	-0.6	-0.4	-1.1	-1.0	0.6	10	0.0	0.5	0.0	-0.2	7	0.0	-0.9	0.0	0.0	-4.8
	4069	410	30	0.4	-1.6	0.1	-0.2	-0.3	0.1	20	0.0	0.3	0.0	-0.9	8	0.0	0.0	0.0	0.0	-4.8
B. longum subsp. infantis	4018	425	328	24.1	-0.9	1.6	-9.8	-11.4	-1.8	370	32.6	-0.3	6.0	-37.2	370	38.0	-0.3	2.7	0.3	-26.5
	4020	390	355	1.6	-1.8	0.0	-11.7	-4.3	-1.2	315	20.9	-0.4	6.3	-35.4	325	1.3	-0.2	0.6	0.0	-9.3
B. adolescentis	4011	370	410	4.0	-1.6	2.2	-8.9	-13.9	-2.0	400	10.8	-0.1	5.9	-33.1	386	6.2	-0.3	0.0	0.9	-19.6
	4045	360	315	9.6	-2.0	-0.4	-11.1	-8.0	-1.6	398	11.1	0.4	2.9	-34.6	340	1.6	-0.4	0.0	0.6	-11.7
B. longum subsp. longum	4021	520	390	-0.4	-2.1	-0.2	-11.4	-2.6	-1.1	440	1.4	-0.9	2.5	-32.3	370	0.0	-0.5	0.0	0.0	-7.6
	4037	450	330	0.4	-1.6	-0.1	-11.1	-3.9	-1.1	405	1.1	-0.2	4.2	-32.8	278	0.0	0.0	0.0	0.0	-11.9
B. catenulatum	4016	363	380	3.9	-1.8	-0.2	-11.4	-5.8	-1.5	470	19.0	-0.4	3.3	-37.4	395	2.9	-0.3	0.0	0.3	-13.6
B. pseudocatenulatum	4072	375	370	6.8	-2.3	-0.1	-11.1	-9.1	-1.3	400	9.5	-0.5	2.4	-30.7	370	12.9	-0.6	0.0	0.4	-20.3

*: There may be a component derived from the medium having the same retention time as Glc, but it is expressed as the Glc concentration.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	木村 一雅
審 査 委 員	主査：教授 北澤 春樹 副査：教授 駒井 三千夫 教授 阿部 敬悦
学位論文題目	乳糖分解酵素の転移反応で生成するオリゴ糖の分析技術の開発に関する研究
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>近年、オリゴ糖は第6の栄養素として位置づけられ、「おなかの調子を整える」特定保健用食品など、機能性のある食品への利用が進められている。ヒト臨床試験での有効性が多数報告されているガラクトオリゴ糖（GOS）は、ラクトースにガラクトース1分子が転移したガラクトシルラクトース（GL）を主成分とし、ヒト母乳をはじめ家畜の乳や発酵乳中にも存在する。工業的に乳糖分解酵素を利用して高収量の GOS を得る条件では、ガラクトースの転移位置が異なる単糖から6糖程度の複雑な異性体混合物が得られるが、特定保健用食品の認可には、主たる機能成分の特定と定量のための分析技術を医薬品に準じた質で確立することが義務付けられている。</p> <p>そこで本研究は、この要求に対応するため、従来困難とされていたオリゴ糖異性体を相互に分離し定性・定量する分析技術の開発を目的とした。具体的には、糖タンパク質や糖脂質の糖鎖をピリジルアミノ（PA）誘導体化して分析する技術に着目し、糖鎖長が短く誘導体化反応の試薬と分子サイズに近い GOS に応用するための改良を検討した。反応の条件の再検討、反応後の過剰試薬からの目的糖鎖の分離精製、ODS-HPLC による分離条件の検討などを進め、これまでに報告例の無い、2糖から6糖程度の少糖類のオリゴ糖異性体を単一成分にまで分離する分析条件の構築に成功した。次に、本技術の一般化を目指し、オリゴ糖 PA 誘導体の糖鎖還元末端構造が分子吸光係数や蛍光発光強度に及ぼす影響について、各種グルコース2糖類をモデル化合物として解析し、還元性末端の2位の置換において若干の分子吸光係数の増加と、最大で2倍程度の蛍光発光強度の増大が見られることを見出した他、天然のオリゴ糖の分析にも応用できる道を拓いた。</p> <p>本分析法を用いて、各種乳糖分解酵素による乳糖転移反応により生成する GOS の構造と反応特性の解析を進め、6'-GL、4'-GL、3'-GL をそれぞれ高濃度で含む GOS を選択的に生産する技術を確立した。また、ヒト常在ビフィズス菌による各種市販オリゴ糖の <i>in vitro</i> での資化性を検討し、ビフィズス菌種によるオリゴ糖資化の特徴を明らかにした。</p> <p>本研究は、従来分析が困難であったオリゴ糖の構造異性体を分離できる汎用性のある分析技術を確立し、それにより乳糖分解酵素による転移反応の詳細な特性解析を可能とし、安全で有用性の高い食品素材 GOS の開発に至った研究として高く評価される。従って審査員一同は本論文について博士（農学）の学位を授与するに値するものと判断した。</p>	